

Identifikasi molekuler Bakteri Asam Laktat dari Tempe dan Tape Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA

Sulistiani¹ dan Iman Hidayat¹

¹Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Indonesia

E-mail: sulis_lipi@yahoo.com

Abstract

Indonesia has varied of fermented food. However, the discovery of the microbial diversity in the Indonesian traditional fermented food is inadequately conducted. In this study, we determined the lactic acid bacteria (LAB) diversity from *tempeh* and *tape* based on the nucleotide sequence of 16S rRNA gene to obtain information on the biodiversity of lactic acid bacteria in *tempeh* and *tape* origin Bali Province, and collection of lactic acid bacteria isolates have beneficial for the development of starters, food science, and genetic resources. A total of six samples of *tempeh* and six samples of *tape* were collected from Bali province. A viable count method showed that the LAB population in *tempeh* was $3.8 \times 10^8 - 2.2 \times 10^9$ cfu/g and in *tape* was $4 \times 10^5 - 1.1 \times 10^8$ cfu/g. A molecular identification based on the nucleotide sequence of 16S rRNA gene determined six LAB species existed in *tempeh* (*Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella paramesenteroide*) and six species in *tape* (*L. fermentum*, *L. kunkeei*, *L. plantarum*, *L. vini*, *Leuconostoc mesenteroides*, *P. pentosaceus*, *W. paramesenteroides*). Physiological characterization showed that all LAB isolates grew on medium containing 3% NaCl at pH 4 and pH 6.5, and at temperatures of 30°C and 45°C. Three isolates of *P. pentosaceus* (Su-Is21, Su-Is22, Su-Is24) exhibited catalase activity and 17 isolates belong to halotolerant bacteria, which can grow on medium containing 6.5% NaCl.

Keywords: Bali, Lactic acid Bacteria, gen 16S rRNA, Tape, Tempeh

Abstrak

Indonesia adalah negara yang kaya akan makanan fermentasi. Akan tetapi, pengungkapan biodiversitas mikroorganisme dalam makanan fermentasi tradisional Indonesia masih belum banyak dilakukan. Dalam penelitian ini, keanekaragaman bakteri asam laktat (BAL) pada tempe dan tape diungkapkan menggunakan metode molekuler berdasarkan urutan nukleotida gen 16S rRNA untuk memperoleh informasi keanekaragaman bakteri asam laktat di dalam tempe dan tape dari provinsi Bali dan koleksi isolat bakteri asam laktat dapat bermanfaat untuk pengembangan starter, *food science* serta sumber *genetic resources*. Sebanyak 6 sampel tempe dan 6 sampel tape berhasil dikoleksi dari provinsi Bali. Berdasarkan metode *viable count method*, jumlah populasi BAL di dalam tempe berkisar $3,8 \times 10^8 - 2,2 \times 10^9$ cfu/g dan di dalam tape sekitar $4 \times 10^5 - 1,1 \times 10^8$ cfu/g. Identifikasi molekuler berdasarkan data sekuen nukleotida gen 16S rRNA menunjukkan sebanyak enam spesies BAL ada di tempe (*L. fermentum*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *W. paramesenteroides*); dan 6 spesies BAL di tape (*L. fermentum*, *L. kunkeei*, *L. plantarum*, *L. vini*, *Leuconostoc mesenteroides*, *P. pentosaceus*, *W. paramesenteroides*). Karakterisasi fisiologi menunjukkan bahwa semua isolat BAL tumbuh pada medium yang mengandung NaCl 3% pada kondisi pH 4 dan pH 6,5, dan pada kondisi suhu 30°C dan 45°C. Tiga isolat *P. pentosaceus* (Su-Is21, Su-Is22, Su-Is24) menunjukkan aktivitas katalase, dan sebanyak 17 isolat BAL merupakan kelompok bakteri halotolerant yang mampu tumbuh pada medium yang mengandung 6,5% NaCl.

Kata kunci: Bakteri asam laktat, Bali, gen 16S rRNA, Tape, Tempe.

Pendahuluan

Tempe adalah makanan tradisional Indonesia yang dibuat dari kedelai yang difermentasi secara terkontrol menggunakan ragi jamur (umumnya *Rhizopus oligosporus*). Tempe telah menjadi makanan sehari-hari masyarakat Indonesia ratusan tahun dan bahkan sudah diakui secara internasional sebagai makanan fermentasi yang sehat dengan kandungan nutrisi yang tinggi. Selain itu, tempe juga dikenal sebagai sumber senyawa bioaktif seperti antioksidan (Nurdini *et al.*, 2015). Selain jamur *R. oligosporus*, kelompok mikroorganisme lain juga diketahui berpartisipasi di dalam proses fermentasi tempe (Feng *et al.*, 2005, Barus & Wijaya, 2011).

Tape atau tapai adalah kudapan yang dihasilkan dari proses fermentasi substrat/bahan pangan berkarbohidrat menggunakan ragi khamir seperti *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fibuligera*, *Candida utilis*, *Endomycopsis burtonii*, dan beberapa mikroorganisme lain seperti *R. oryzae*, *Mucor* sp., *Pediococcus* sp., dan termasuk kelompok bakteri asam laktat. Di Indonesia dan negara-negara sekitarnya, substrat ini biasanya berupa umbi singkong, beras ketan, dan beras. Tape umumnya berbentuk semi cair, lunak, berasa manis keasaman, mengandung alkohol, dan memiliki tekstur lengket (Gandjar, 2003).

Bakteri asam laktat telah lama digunakan manusia untuk produksi makanan dan pengawetan makanan seperti yogurt, sawi asin,

keju, sauerkraut, dan lainnya. Beberapa penelitian menyebutkan keberadaan bakteri asam laktat di tempe dan tape (Bettache *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2005; Mulyowidarso *et al.*, 1990). Keterlibatan bakteri asam laktat di dalam tempe dan tape masih mendapatkan perhatian dan kajian ekstensif terkait dengan perannya dalam kualitas makanan fermentasi dan keamanan pangan tersebut. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi kelompok bakteri asam laktat dari tempe dan tape asal Bali secara molekuler berdasarkan data sekuen nukleotida gen 16S rRNA serta analisis kekerabatannya menggunakan metode analisis filogenetik. Manfaat dari penelitian ini adalah, selain memperoleh informasi biodiversitas bakteri asam laktat di dalam tempe dan tape, isolat-isolat bakteri asam laktat yang diperoleh dapat digunakan untuk pengembangan starter multikultur, *food science* serta *genetic resources* untuk industri makanan fermentasi di Indonesia.

Metode

Sampel tape dan tempe diperoleh dari pasar tradisional, pasar modern, dan industri tempe dari beberapa wilayah di provinsi Bali, dalam Tabel 1. Sampel disimpan di dalam kotak

es 4°C kemudian dibawa ke Laboratorium di Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI untuk dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat yang terkandung di dalam sampel.

Isolasi dan penghitungan bakteri asam laktat di dalam sampel dilakukan dengan menggunakan teknik *viable count method* pada medium selektif MRS Agar (*De Man, Rogosa, Sharpe Agar*) yang ditambah dengan agen anti jamur (Nystatin 500mg/L). Pengenceran serial dilakukan menggunakan akuades mulai dari pengenceran 10⁻²g/mL (1 g sampel padat dilarutkan dalam 99 mL akuades steril atau 1 mL sampel cair dilarutkan dalam 99 mL akuades steril) sampai pengenceran 10⁻⁷g/mL. Dari Sampel yang telah diencerkan, diambil sebanyak 100 µL untuk ditumbuhkan pada medium MRSA dan kemudian diinkubasi di dalam *anaerobic jar* selama 4 hari pada temperatur ruang (28-30°C). Bakteri yang membentuk zona bening diduga sebagai bakteri asam laktat karena kelompok bakteri ini menghasilkan asam yang mampu melarutkan CaCO₃ (Cai *et al.*, 1999). Koloni bakteri asam laktat kemudian dihitung, dipurifikasi, diidentifikasi, dan dikarakterisasi lebih lanjut.

Tabel 1. Nama, asal dan data GPS lokasi pengambilan sampel tempe dan tape di provinsi Bali.

| No | Nama Sampel | Asal Sampel | Data GPS |
|----|---|--|---------------------------|
| 1 | Tempe kedelai Mas No. | Pasar tradisional Badung Denpasar – Bali | 08°39.343S 115°12.762E |
| 2 | Tempe kedelai sari rasa merek Durian. | Pasar Modern Tiara Dewata Jl. Mayjen Sutoyo No.55 Denpasar Bali | 08°39.686S 115°12.820E |
| 3 | Tempe kedelai "Singaraja" | Pasar tradisional Baturiti Kota Tabanan Bali | 08°19.520S 115°11.141E |
| 4 | Tempe kedelai UD Darma | UD. Dharma (industri tahu dan tempe) Kota Denpasar Bali | 08°39.343S 115°12.762E |
| 5 | Tempe kedelai merek Tiara. | Pasar Modern Tiara Dewata Jl. Mayjen Sutoyo No.55 Denpasar Bali | 08°39.686S 115°12.820E |
| 6 | Tempe kedelai merek Vinar. | Pasar Modern Tiara Dewata Jl. Mayjen Sutoyo No.55 Denpasar Bali | 08°39.686S 115°12.820E |
| 7 | Brem bali (cairan dari fermentasi tape ketan) | Pasar tradisional Badung Denpasar - Bali | 08°39.343S 115°12.762E |
| 8 | Tape ketan | Pasar tradisional Badung Denpasar - Bali | 08°39.343S 115°12.762E |
| 9 | Tape beras | Tanah Lot Kota Tabanan Bali | 08°37.021S 115°05.305E |
| 10 | Tape singkong I | Pasar tradisional Badung Denpasar - Bali | 08°39.343S 115°12.762E |
| 11 | Tape singkong II | Pasar tradisional Badung Denpasar - Bali | 08°39.343S 115°12.762E |
| 12 | Tape singkong III | Pasar tradisional Badung Denpasar - Bali | 08°39.343S 115°12.762E |

Ekstraksi genom bakteri dilakukan menggunakan metode *guanidium thiocyanate-EDTA-sodium lauryl sarcosinate* (GES) (Pitcher *et al.*, 1989). Sebanyak 3 ose bakteri yang tumbuh pada medium MRSA selama 3 hari dimasukkan ke dalam tabung mikro kemudian ditambahkan 1 mL *buffer* TE. Sampel kemudian dihomogenkan selama 10 detik dan disentrifugasi 3000 x g selama 15 menit, kemudian supernatan dibuang. Pada suspensi pelet ditambahkan 50 µL larutan lisozim (50 µg/mL) dan dihomogenkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Reagen GES sebanyak 250 µL ditambahkan, dan selanjutnya dicampur secara pelan menggunakan pipet dan didiamkan selama 10 menit. Sebanyak 125 µL *ammonium acetate* 7,5 M ditambahkan ke dalam sampel dan kemudian sampel diinkubasi di dalam es selama 10 menit. Setelah inkubasi sebanyak 500 µL *chloroform* ditambahkan dan kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak-balik sebanyak 50 kali. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 9.300 x g selama 10 menit untuk memisahkan fase air dan fase *chloroform*. Fase air kemudian dipindahkan ke tabung mikro baru dan ditambahkan isopropanol sebanyak setengah volume fase air, kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak-balik sampai terlihat benang-benang DNA. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 9.300 x g selama 10 menit dan kemudian supernatan dibuang. Pada suspensi pelet yang terbentuk ditambahkan 1 mL alkohol 70% dan dihomogenkan dengan cara dibolak-balik kemudian disentrifugasi pada kecepatan 9.300 x g selama 5 menit, dan kemudian supernatan dibuang. DNA dikering-anginkan selama 30 menit kemudian ditambahkan 25 µL *buffer* TE atau volume *buffer* TE disesuaikan dengan jumlah DNA yang diperoleh.

DNA yang diperoleh dianalisis menggunakan metode elektroforesis gel. Sebanyak 2 µL DNA dicampurkan dengan 1 µL *loading dye* kemudian dielektroforesis ke dalam agarosa 0,8%, pada voltase 100 V selama 15 menit. Gel kemudian direndam dalam larutan ethidium bromida (EtBr) selama 15 menit. Gel kemudian dicuci menggunakan TAE 1X dan kemudian didokumentasi menggunakan *gel documentation system*.

Amplifikasi PCR gen 16S rRNA dilakukan berdasarkan metode Promega (2016) dengan volume per reaksi 30 µL menggunakan primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Primer 27F mempunyai posisi 8-27 dan primer 1492R mempunyai posisi 1510-1492 pada kromosom *E. coli* (Nikolova *et al.*, 2009). Komposisi reaksi PCR terdiri atas: 15 µL GoTag® Green master mix 2x, 2,4 µL primer 27F 10 µM dan 2,4 µL primer 1492R 10 µM, 9,2 µL NFW dan 1µL (10-100 ng) cetakan DNA. Reaksi PCR

dilakukan menggunakan mesin PCR (TaKaRa, Jepang) dengan kondisi pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 90 detik, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan pada suhu 50°C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 90 detik. Setelah 30 siklus selesai, diikuti fase ekstensi lanjutan pada suhu 72°C selama 5 menit dan dilanjutkan dengan fase pendinginan pada suhu 4°C selama 20 menit (Promega, 2016). Hasil amplifikasi dielektroforesis dalam agarosa 1% selama 25 menit pada 100V. Gel hasil elektroforesis direndam dalam larutan EtBr selama 15 menit. Hasil amplifikasi DNA didokumentasi menggunakan *gel documentation system*. Ukuran pita DNA hasil amplifikasi PCR diukur menggunakan DNA *ladder* 1 kb (Promega).

Purifikasi hasil PCR, siklus sekuensing, purifikasi produk siklus sekuensing, dan sekuensing produk PCR dilakukan di laboratorium Macrogen (Korea selatan). Semua produk PCR gen 16S rRNA di sekuensing menggunakan primer 27F. Hasil sekuen DNA diedit menggunakan program BioEdit (Hall, 1999). Pencarian sekuen homolog dari GenBank dilakukan menggunakan program aplikasi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Analisis filogenetik dilakukan menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) versi 5.2 menggunakan metode *neighbor joining* (NJ) (Tamura *et al.*, 2011). Parameter-parameter yang digunakan yaitu: model substitusi menggunakan *Kimura 2-parameter model*, gap diperlakukan sebagai '*missing data*'. Pemilihan model substitusi didasarkan dari hasil analisis menggunakan *Find best DNA/Protein Models* (ML) pada program Mega. Kekuatan pohon filogenetik diuji menggunakan metode *bootstrap* (Efron, 1979) dengan 1000 kali ulangan.

Karakterisasi fenotipik BAL dilakukan dengan menumbuhkan bakteri asam laktat di medium MRSA diinkubasi pada suhu ruang (28-30°C) selama 3 hari kemudian dilakukan pengecatan Gram dan tes katalase. Selain itu juga dilakukan uji fisiologis bakteri asam laktat terhadap garam (3%, 6,5%, dan 10%), pertumbuhan pada kondisi temperatur yang berbeda (5°C, 30°C, 45°C dan 60°C), dan pH yang berbeda (2, 4 dan 6,5) menggunakan medium MRS cair (Djadouni & Kihal, 2012). Tes katalase dilakukan dengan menambahkan larutan hidrogen peroksida 3% ke dalam cawan petri yang berisi bakteri asam laktat. Gelembung udara yang terbentuk menunjukkan bakteri mempunyai enzim katalase yang mampu memecah hidrogen peroksida (Tiwari *et al.*, 2003 dan De Vos *et al.*, 2009).

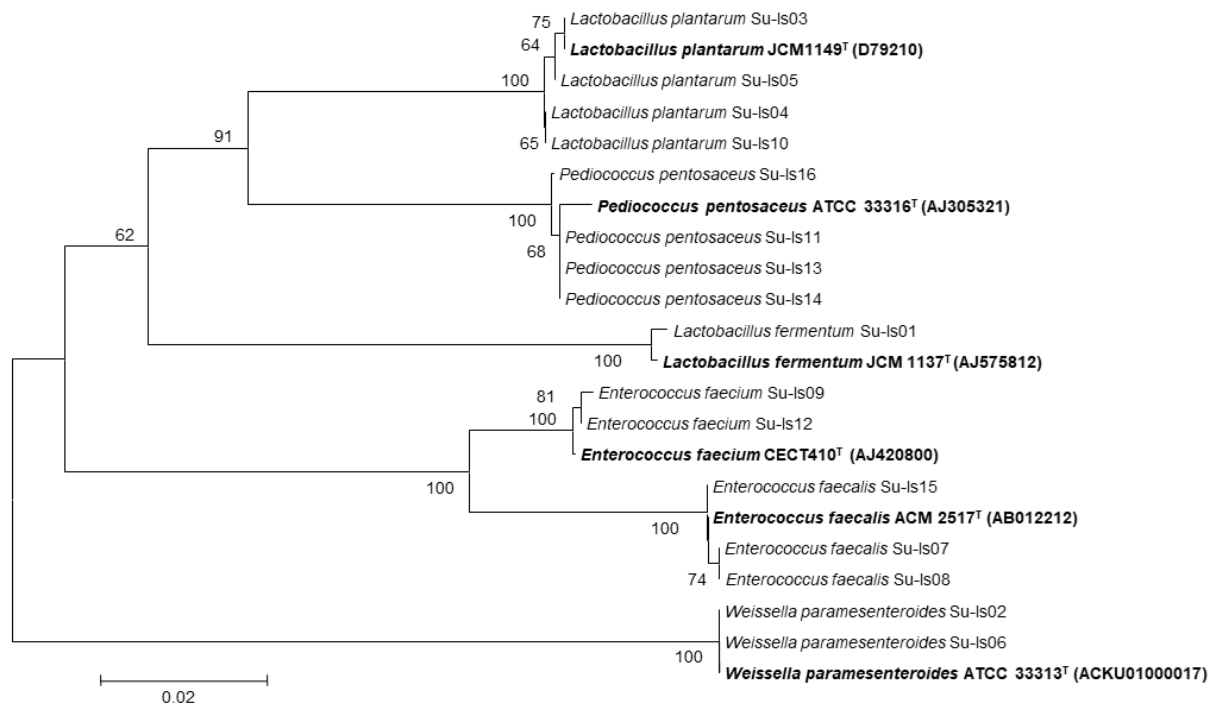
Hasil dan Pembahasan

Hasil BLAST dari data sekuen nukleotida gen 16S rRNA berhasil mengidentifikasi enam spesies bakteri asam laktat pada tempe yaitu *L. fermentum* strain Su-Is01, *L. plantarum* (strain Su-Is03, Su-Is04, Su-Is05, Su-Is10), *E. faecalis* (strain Su-Is07, Su-Is08, Su-Is15), *E. faecium* (strain Su-Is09, Su-Is12), *P. pentosaceus* (strain Su-Is11, Su-Is12, Su-Is14, Su-Is16), dan *W. paramesenteroides* (strain Su-Is02, Su-Is06) dengan homologi 99-100% terhadap sekuen *type strain* di NCBI GenBank (Tabel 2). Hasil identifikasi dikuatkan secara taksonomi melalui analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining* dengan nilai *bootstrap* yang kuat antara 62-100% pada masing-masing spesies yang menempati kluster/klade posisi yang sama (1 klade) dengan spesies tipenya (*type strain*) (Gambar 1). Efron (1979) menyebutkan Nilai *bootstrap* di atas 50% mengindikasikan bahwa spesies-spesies yang berada satu klade merupakan spesies yang sama.

Spesies-spesies bakteri asam laktat pada masing-masing sampel tempe cukup beragam. Di dalam tempe kedelai merek Mas No terdapat tiga spesies (*L. fermentum*, *W. paramesenteroides*, dan *L. plantarum*), tempe kedelai merek 'Sari rasa-Durian' terdapat 1 spesies (*E. faecalis*), tempe kedelai 'Singaraja' terdapat 2 spesies (*E. faecalis*, *E. faecium*), tempe kedelai 'UD Darma' terdapat 3 spesies (*L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *E. faecium*), tempe kedelai 'Tiara' terdapat 1

spesies (*P. pentosaceus*), dan tempe kedelai 'Vinar' terdapat 2 spesies (*E. faecalis*, *P. pentosaceus*). Keberagaman spesies bakteri asam laktat ini mungkin disebabkan oleh Teknik pembuatan tempe di Indonesia yang tidak memiliki standar khusus (Efrwati *et al.*, 2013) dan fermentasi tempe tidak dilakukan dalam kondisi aseptik walaupun menggunakan starter inokulum pada proses tersebut (Nurdini, 2015). Spesies bakteri asam laktat yang berbeda dimungkinkan mempunyai kemampuan beradaptasi yang berbeda di kondisi lingkungan dan substrat yang berbeda (Wood & Holzapfel, 1995).

Hasil penghitungan populasi bakteri asam laktat dalam tempe menunjukkan jumlah populasi bakteri asam laktat yang bervariasi dalam setiap sampel. Jumlah populasi bakteri asam laktat di dalam tempe berkisar $3,8 \times 10^8 - 2,2 \times 10^9$ cfu/g (Tabel 2). Mulyowidarso *et al.* (1990) melaporkan populasi bakteri asam laktat di tempe sebanyak 6-7 log cfu/g setelah inkubasi 36 jam di laboratorium. Sementara Moreno *et al.* (2002) melaporkan populasi bakteri asam laktat dalam tempe di kisaran 6,8-9,9 log cfu/g. Efrwati *et al.* (2013) menyebutkan populasi BAL dalam tempe di Bogor dengan metode produksi A (dari proses pembuatan tempe merek EMP) sebesar 7,91 log cfu/g dan dalam tempe dengan metode produksi B (dari proses pembuatan tempe merek WJB) sebesar 6,54 log cfu/g. Variasi jumlah bakteri asam laktat dalam tempe tersebut dimungkinkan karena pembuatan tempe tidak memiliki standar khusus di Indonesia.



Gambar 1. Pohon filogenetik bakteri asam laktat dari 6 sampel tempe asal provinsi Bali berdasarkan analisis sekuen gen 16S rRNA menggunakan metode *Neighbor Joining*.

Tabel 2. Penghitungan dan identifikasi bakteri asam laktat di Tempe asal Bali berdasarkan sekuen gen 16S rRNA.

| No. | Sampel | Jumlah Populasi | Spesies | Strain | Homologi (%) |
|-----|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------|--------------|
| 1 | Tempe kedelai 'Mas No' | 6,9 x 10 ⁸ cfu/g | <i>L. fermentum</i> | Su-Is01 | 99 |
| | | | <i>W. paramesenteroides</i> | Su-Is02 | 99 |
| | | | <i>L. plantarum</i> | Su-Is03 | 100 |
| | | | <i>L. plantarum</i> | Su-Is04 | 99 |
| | | | <i>L. plantarum</i> | Su-Is05 | 99 |
| | | | <i>W. paramesenteroides</i> | Su-Is06 | 99 |
| 2 | Tempe kedelai 'Sari rasa-Durian' | 3,8 x 10 ⁸ cfu/g | <i>E. faecalis</i> | Su-Is07 | 99 |
| 3 | Tempe kedelai 'Singaraja' | 1,15 x 10 ⁹ cfu/g | <i>E. faecalis</i> | Su-Is08 | 99 |
| | | | <i>E. faecium</i> | Su-Is09 | 99 |
| 4 | Tempe kedelai 'UD Darma' | 2,2 x 10 ⁹ cfu/g | <i>L. plantarum</i> | Su-Is10 | 99 |
| | | | <i>P. pentosaceus</i> | Su-Is11 | 100 |
| | | | <i>E. faecium</i> | Su-Is12 | 99 |
| | | | <i>P. pentosaceus</i> | Su-Is13 | 100 |
| 5 | Tempe kedelai 'Tiara' | 1,3 x 10 ⁹ cfu/g | <i>P. pentosaceus</i> | Su-Is14 | 100 |
| 6 | Tempe kedelai 'Vinar' | 4 x 10 ⁸ cfu/g | <i>E. faecalis</i> | Su-Is15 | 100 |
| | | | <i>P. pentosaceus</i> | Su-Is16 | 99 |

Mikroflora dalam tempe bersifat kompleks, karena tempe merupakan hasil fermentasi kultur campuran oleh kapang, khamir, bakteri asam laktat, dan berbagai bakteri lainnya. Genus utama yang penting adalah jamur *Rhizopus* dengan spesies berbeda seperti *R. microsporus*, *R. oligosporus*, dan *R. oryzae* (Nout & Kiers, 2005). Kelompok bakteri asam laktat berperan dalam pengasaman kacang kedelai selama perendaman, sehingga mencegah pertumbuhan mikroorganisme pembusuk (Ashenafi & Busse, 1991) dan dengan demikian meningkatkan umur simpan tempe. Selama fermentasi, bakteri asam laktat tumbuh hingga 10⁹ cfu/g di dalam produk tempe akhir. Kontribusi bakteri dan khamir di tempe masih belum dipahami sepenuhnya, tetapi mereka dapat berperan dalam peningkatan kualitas rasa dan modifikasi substrat serta keamanan produk (Nout & Rombouts, 1990).

Secara umum, sterilisasi bahan kedelai dari kontaminasi mikroorganisme pada proses pembuatan tempe dilakukan dengan merebus kedelai, akan tetapi, terjadinya kontaminasi ulang tetap tinggi. Populasi bakteri asam laktat di dalam tempe dapat berasal dari inokulum tempe, kontak dengan dengan pekerja, peralatan, dan dari lingkungan tempat produksi tempe (Nout & Kiers, 2005; Mulyowidarso *et al.*, 1990). Dalam pengolahan tempe, bakteri asam laktat merupakan kelompok mikroorganisme umum yang mengkolonisasi tempe dapat meningkatkan manfaat nutrisi kepada konsumen, terutama efek probiotik. Kelompok bakteri asam laktat memainkan peran penting mulai dari tahap perendaman kedelai dengan mengasamkan air hingga tahap fermentasi, sehingga mencegah pertumbuhan mikroorganisme pembusuk (Pisol

et al., 2015, Pisol *et al.*, 2013) dan memastikan keamanan tempe kedelai (Ashenafi, 1991).

Tempe kedelai tradisional mengandung banyak mikroorganisme yang berpotensi efek menguntungkan atau merugikan pada kualitas kandungan nutrisinya. Kelompok bakteri asam laktat memiliki efek positif pada keamanan tempe kedelai, terutama efek probiotik yang melindungi system pencernaan dari *E. coli* di dalam usus. Feng *et al.* (2005) melaporkan beberapa spesies bakteri asam laktat tertentu yang dapat tumbuh bersama dengan *R. oligosporus* dan tidak mengganggu pertumbuhan jamur di tempe serta tidak mengubah tampilan produk akhir. Ini memungkinkan bakteri asam laktat dapat digunakan sebagai ko-kultur dengan *R. oligosporus* untuk meningkatkan keamanan dan kualitas fermentasi tempe kedelai. Sedangkan *Coliform* dan *Salmonella sp.* dalam jumlah berlebih dalam tempe dapat menurunkan kualitas dan membahayakan konsumen karena dapat menimbulkan infeksi akibat toksin yang dihasilkan (Pragita dkk, 2017).

Seperti halnya tempe, tape juga dibuat dengan menggunakan starter, pembuatannya dilakukan secara terbuka sehingga memungkinkan mikroorganisme dari lingkungan dapat mengkontaminasi dan tumbuh selama proses fermentasi (Nuraida, 2015). Kelompok bakteri asam laktat di dalam 6 sampel tape dari Bali (1 tape ketan, 1 tape beras, 3 tape singkong dan 1 Brem bali) menunjukkan jumlah yang bervariasi, berkisar 4 x 10⁵ – 1,1 x 10⁸ cfu/g (Tabel 3).

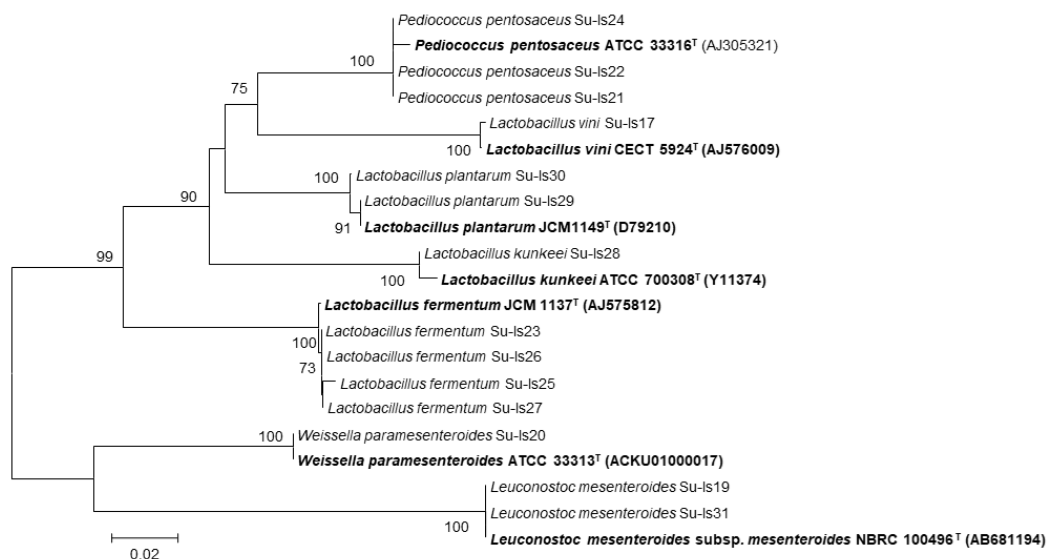
Berdasarkan hasil BLAST data sekuen gen 16S rRNA bakteri asam laktat dari sampel tape dari Bali terhadap sekuen-sekuen tipe (*type strain*) dari NCBI GenBank, ditemukan enam

spesies bakteri asam laktat yaitu *L. fermentum* (Su-Is23, Su-Is25, Su-Is26, Su-Is27), *L. kunkeei* Su-Is28, *L. plantarum* (Su-Is29, Su-Is30), *L. vini* Su-Is17, *Leuconostoc mesenteroides* (Su-Is19, Su-Is31), *P. pentosaceus* (Su-Is21, Su-Is22, Su-Is24), dan *W. paramesenteroides* Su-Is20 dengan homologi 99-100% (Tabel 3). Seperti tempe, spesies-spesies bakteri asam laktat di dalam masing-masing sampel tape juga beragam. Dalam brem bali ditemukan 1 spesies (*L. vini*), di tape ketan ditemukan 1 spesies (*Leuconostoc mesenteroides*), di tape beras ditemukan 2 spesies (*W. paramesenteroides* dan *P. pentosaceus*), di tape singkong I ditemukan 2 spesies (*L. fermentum* dan *P. pentosaceus*), di tape singkong II ditemukan 1 spesies (*L. fermentum*), dan di tape singkong III ditemukan 3 spesies (*L. kunkeei*, *L. plantarum*, dan *Leuconostoc mesenteroides*).

Hasil analisis filogenetik juga menunjukkan bahwa ada enam spesies bakteri asam laktat pada sampel tape yaitu *P. pentosaceus* (100% BS), *L. vini* (100% BS), *L. plantarum* (100% BS), *L. kunkeei* (100% BS), *L. fermentum* (100% BS), *W. paramesenteroides* (100% BS), dan *Leuconostoc mesenteroides* (100% BS) (Gambar 2). Chiang *et al.* (2006) melaporkan beberapa spesies bakteri asam laktat di dalam tape dari wilayah Sabah (Malaysia) antara lain *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. collinoides*, dan *Pediococcus* sp. Nur'azizah & Kumarawati (2016) juga berhasil mengidentifikasi spesies-spesies bakteri asam laktat di dalam tape ketan seperti *L. curvatus*, *L. fermentum*, *P. pentosaceus*, *E. villorum*, *E. faecium*, *W. confusa*, *W. paramesenteroides*, dan *W. kimchii*.

Tabel 3. Penghitungan dan identifikasi bakteri asam laktat pada Tape Bali berdasarkan sekuen gen 16S rRNA.

| No. | Sampel | Jumlah Populasi | Spesies | Strain | Homologi (%) |
|-----|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|--------------|
| 1 | Brem Bali | 4 x 10 ⁵ cfu/mL | <i>L. vini</i> | Su-Is17 | 99 |
| 2 | Tape ketan | 1,7 x 10 ⁶ cfu/g | <i>L. mesenteroides</i> | Su-Is19 | 99 |
| 3 | Tape beras | 1,7 x 10 ⁶ cfu/g | <i>W. paramesenteroides</i> | Su-Is20 | 100 |
| | | | <i>P. pentosaceus</i> | Su-Is21 | 99 |
| | | | <i>P. pentosaceus</i> | Su-Is22 | 100 |
| 4 | Tape singkong I | 1 x 10 ⁵ cfu/g | <i>L. fermentum</i> | Su-Is23 | 99 |
| | | | <i>P. pentosaceus</i> | Su-Is24 | 99 |
| 5 | Tape singkong II | 1,1 x 10 ⁸ cfu/g | <i>L. fermentum</i> | Su-Is25 | 99 |
| | | | <i>L. fermentum</i> | Su-Is26 | 99 |
| | | | <i>L. fermentum</i> | Su-Is27 | 99 |
| 6 | Tape singkong III | 5,5 x 10 ⁷ cfu/g | <i>L. kunkeei</i> | Su-Is28 | 99 |
| | | | <i>L. plantarum</i> | Su-Is29 | 99 |
| | | | <i>L. plantarum</i> | Su-Is30 | 99 |
| | | | <i>L. mesenteroides</i> | Su-Is31 | 99 |



Gambar 2. Pohon filogenetik bakteri asam laktat dari 6 sampel tape asal provinsi Bali berdasarkan analisis sekuen gen 16S rRNA menggunakan metode Neighbor Joining.

Tabel 4. Karakterisasi fisiologi bakteri asam laktat dari sampel Tape dan Tempe asal provinsi Bali.

| No | Identitas | Strain | Gram | Katalase | pH | | | NaCl | | | Temperatur | | | |
|----|-----------------------------|---------|------|----------|----|---|-----|------|------|-----|------------|------|------|------|
| | | | | | 2 | 4 | 6,5 | 3% | 6,5% | 10% | 5°C | 30°C | 45°C | 60°C |
| 1 | <i>L. fermentum</i> | SU-LS01 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 2 | <i>W. paramesenteroides</i> | SU-LS02 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 3 | <i>L. plantarum</i> | SU-LS03 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 4 | <i>L. plantarum</i> | SU-LS04 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 5 | <i>L. plantarum</i> | SU-LS05 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 6 | <i>W. paramesenteroides</i> | SU-LS06 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 7 | <i>E. faecalis</i> | SU-LS07 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 8 | <i>E. faecalis</i> | SU-LS08 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 9 | <i>E. faecium</i> | SU-LS09 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 10 | <i>L. plantarum</i> | SU-LS10 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 11 | <i>P. pentosaceus</i> | SU-LS11 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 12 | <i>E. faecium</i> | SU-LS12 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 13 | <i>P. pentosaceus</i> | SU-LS13 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 14 | <i>P. pentosaceus</i> | SU-LS14 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 15 | <i>E. faecalis</i> | SU-LS15 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 16 | <i>P. pentosaceus</i> | SU-LS16 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 17 | <i>L. mesenteroides</i> | SU-LS19 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 18 | <i>W. paramesenteroides</i> | SU-LS20 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 19 | <i>P. pentosaceus</i> | SU-LS21 | + | + | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 20 | <i>P. pentosaceus</i> | SU-LS22 | + | + | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 21 | <i>L. fermentum</i> | SU-LS23 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 22 | <i>P. pentosaceus</i> | SU-LS24 | + | + | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 23 | <i>L. fermentum</i> | SU-LS25 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 24 | <i>L. fermentum</i> | SU-LS26 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 25 | <i>L. fermentum</i> | SU-LS27 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 26 | <i>L. plantarum</i> | SU-LS29 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 27 | <i>L. plantarum</i> | SU-LS30 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| 28 | <i>L. mesenteroides</i> | SU-LS31 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |

Hasil karakterisasi fisiologi bakteri asam laktat menunjukkan bahwa semua isolat tumbuh pada medium yang mengandung NaCl 3%, pH (4 dan 6,5), dan mampu tumbuh pada suhu 30°C dan 45°C (Tabel 3). Tiga strain *P. pentosaceus* (strain Su-Is21, Su-Is22, Su-Is24) memiliki aktivitas katalase positif dan sebanyak 17 strain (strain Su-Is03, Su-Is04, Su-Is05, Su-Is10, Su-Is13, Su-Is14, Su-Is16, Su-Is19, Su-Is20, Su-Is21, Su-Is22, Su-Is23, Su-Is24, Su-Is27, Su-Is29, Su-Is30 dan Su-Is31) merupakan bakteri asam laktat yang halotoleran, dimana mampu tumbuh pada medium yang mengandung NaCl 6,5% (Tabel 4).

Dari penelitian ini menunjukkan bahwa tempe dan tape mengandung berbagai spesies bakteri asam laktat dengan karakter fisiologi yang beragam. Semua spesies bakteri asam laktat dari penelitian ini merupakan sumberdaya genetik yang berpotensi unggul sebagai bahan penelitian lebih lanjut, terutama untuk pembuatan starter/inokulum unggul dan terstandarisasi bagi pengembangan produksi komersial skala kecil dan besar, dimana starter/inokulum ini akan mampu meningkatkan nilai nutrisi, kesehatan terhadap manusia, stabil secara mikrobiologis, dan mendapat penerimaan cita rasa yang lebih baik dari konsumen, serta mampu meningkatkan keamanan produk fermentasi karena lebih terkontrol proses produksinya. Selain itu, spesies-spesies bakteri asam laktat dari penelitian ini dapat diseleksi untuk pemanfaatan lainnya seperti

produksi enzim, bahan starter/inokulum untuk makanan probiotik, dan nutrasetikal untuk peningkatan kesehatan manusia.

Simpulan

Sebanyak enam spesies bakteri asam laktat ditemukan dari sampel tempe di provinsi Bali, yaitu *L. fermentum* (Su-Is01), *L. plantarum* (Su-Is03, Su-Is04, Su-Is05, Su-Is10), *E. faecalis* (Su-Is07, Su-Is08, Su-Is15), *E. faecium* (Su-Is09, Su-Is12), *P. pentosaceus* (Su-Is11, Su-Is12, Su-Is14, Su-Is16), *W. paramesenteroides* (Su-Is02, Su-Is06). Selain itu, enam spesies bakteri asam laktat dari sampel tape yang berasal dari provinsi Bali juga berhasil diidentifikasi, yaitu *L. fermentum* (Su-Is23, Su-Is25, Su-Is26, Su-Is27), *L. kunkeei* Su-Is28, *L. plantarum* (Su-Is29, Su-Is30), *L. vini* (Su-Is17), *Leuconostoc mesenteroides* (Su-Is19, Su-Is31), *P. pentosaceus* (Su-Is21, Su-Is22, Su-Is24), dan *W. paramesenteroides* (Su-Is20).

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh DIPA Pusat Penelitian Biologi – LIPI. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang membantu dalam kegiatan penelitian ini.

Daftar Referensi

- Ashenafi, M., 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in Fermenting Tempeh Made of Various Beans and Its Inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiology*, 8(4): 303-310.
- Ashenafi, M. and Busse, M., 1991. The Microflora of Soak Water During Tempeh Production from Various Beans. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(4): 334-338.
- Barus T. dan Wijaya, L.N., 2011. Mikrobiota Dominan dan Perannya dalam Cita Rasa Tape Singkong. *Biota*. 16(2): 354-361.
- Bettache, G., Fatma, A., Miloud, H. and Mebrouk, K., 2012. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. *World Applied Sciences*, 17(4): 480-488.
- Cai, Y., Sumio, K., Masuhiro, O., Yoshimi, B. and Takashi, N., 1999. Characterization and Identification of *Pediococcus* Species Isolated from Forage Crops and Their Application for Silage Preparation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7): 2901-2906.
- Chiang Y. W., Chye, F.Y. and Ismail, M.A., 2006. Microbial Diversity and Proximate Composition of Tapai, A Sabah's Fermented Beverage. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1): 1-6.
- De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K. and Whitman, W.B., 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Firmicutes. Springer. New York.
- Djadouni, F. and Kihal, M., 2012. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria and the Spectrum of Their Biopeptides Against Spoiling Germs in Foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(3): 435-443.
- Efriwati, Suwanto, A., Rahayu, G. and Nuraida, L., 2013. Population Dynamics of Yeasts and Lactic Acid Bacteria (LAB) During Tempeh Production. *HAYATI Journal of Biosciences*, 20 (2): 57-64.
- Efron, B., 1979. Bootstrap methods: Another look at the Jackknife. *The Annals of Statistics*, 7: 1-26.
- Feng, X.M., Eriksson, A.R.B. and Schnurer, J., 2005. Growth of Lactic Acid Bacteria and *Rhizopus oligosporus* During Barley Tempeh Fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 104(3): 249-256.
- Gandjar, I., 2003. Tapai from Cassava and Cereals. Dalam: First International Symposium and Workshop on Insight into the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food Safety; Bangkok, 13 – 17 Apr 2003. Hal.1-10.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium*, 41: 95-98.
- Moreno M.F, Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M. and De Vuyst, L., 2002. Microbial Analysis of Malaysian Tempe, and Characterization of Two Bacteriocins Produced by Isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(1): 147-157.
- Mulyowidarso, R.K., Fleet, G.H. and Buckle, K.A., 1990. Association of Bacteria with The Fungal Fermentation of Soybean Tempe. *Journal of Applied Microbiology*, 68(1): 43-47.
- Nikolova, D., Evstatieva, Y., Georgieva, R., Danova, S., Savov, V., Ilieva, S. and Dalev, P., 2009. Molecular Taxonomic Characterisation of Probiotic Strain *Lactobacillus* sp. 50 P1. *Biotechnology & Biotechnology XI Anniversary Scientific Conference: 779-782*.
- Nout, M.J.R. and Kiers, J.L., 2005. Tempe Fermentation, Innovation and Functionality: Update into The Third Millenium. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4): 789-805.
- Nout, M.J.R. and Rombouts, F.M., 1990. Recent Developments in Tempe Research. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(5): 609-633.
- Nuraida, L., 2015. A review: Health Promoting Lactic Acid Bacteria in Traditional Indonesian Fermented Foods. *Food Science and Human Wellness*, 4(2): 47-55.
- Nurdini, A.L., Nuraida, L., Suwanto A. and Suliantari, 2015. Microbial Growth Dynamics During Tempe Fermentation in Two Different Home Industries. *International Food Research Journal*, 22(4): 1668-1674.
- Nur'azizah, R. and Kumarawati, I.S., 2016. Analysis of Phylogenetic Lactic Acid Bacteria in Glutinous Rice "Tape Ketan" By Bioinformatic Tools in Relation with Its

- Bacteriocin Product. Proceedings of 24th Iserd International Conference, Seoul, South Korea.
- Pisol, B., Nuraida, L., Abdullah, N., Suliantari and Khalil, K.A., 2013. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Indonesian Soybean Tempe. In the 2013 4th International Conference on Biology, Environment and Chemistry IPCBEE, pp: 32–36).
- Pisol B., Abdullah, N., Khalil, K. and Nuraida, L., 2015. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from different Stages of Soybean Tempe Production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(28): 230-234.
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A. and Owen, R.J., 1989. Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4): 151-156.
- Pragita, T.E., Rahayuningsih, M. dan Muslich, 2017. Evaluasi Penyimpangan dan Perbaikan Mutu Tempe Sesuai SNI 3144:2015 Di UMKM. *Jurnal Standardisasi*, 19(2): 113 - 126.
- Promega, 2016. Certificate of Analysis. GoTaq® Green Master Mix. Part# 9PIM712. Promega Corporation.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731-2739.
- Tiwari, R.P., Hoondal, G.S. and Tewari, R., 2003. *Laboratory Techniques in Microbiology & Biotechnology*. Abhlshek Publications. New Delhi.
- Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H., 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. *The Lactic Acid Bacteria*, vol. 2. Blackie Academic & Professional, London, pp. 44-227.